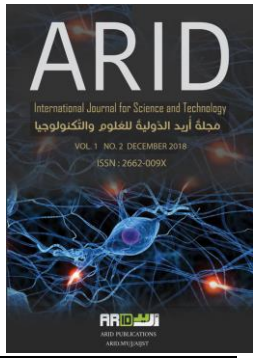
ARID Journals

ARID International Journal for Science and Technology (AIJST)
ISSN: 2662-009X

Journal home page: http://arid.my/j/aijst



مَجلةُ أُريد الدَّوليةُ للعُلومِ والتِّكنولوجيا

العدد 2 ، المجلد 1 ، ديسمبر 2018 م

EVALUATION ACTIVITY OF *TRICHODERMA HARZIANUM* TO CONTROL *FUSARIUM SOLANI, ALTERNARIA SPP., ASPERGILLUS NIGER AND RHIZOPUS SPP.* OF GREENHOUSE FRESH TOMATOES

Intesar Ali Mezeal

Department of Biology, College of Science, Al-Mustansiriyah University, Baghdad, Iraq.

تقييم فعالية الفطر *Trichoderma harzianum* في السيطرة على كلا من الفطريات *Fusarium solani, Alternaria spp., Aspergillus niger , Rhizopus spp* التي تصيب ثمار الطماطة الطازجة

انتصار علي مزعل

قسم علوم الحياة ـ كلية العلوم – الجامعة المستنصرية – بغداد- العراق

intesarali664@uomustansiriyah.edu.iq

ARTICLE INFO
Article history:
Received 01/08/2018
Received in revised form 02/09/2018
Accepted 08/09/2018
Available online 15/12/2018

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the ability of *Trichoderma harzainum* as anti-pathogenic fungi of tomato after harvest which include (*Fusarium solani, Alternaria , Aspergillus niger and Rhizopus*) which was isolated from infected tomato using fungal leachate and spore suspension (10^6 conidia+ mycelia fragments\ml) bio control. The results showed high capacity fungal leachate on inhibition the germination of pathogenic spore in culture media as the percentage of germination of pathogenic fungi which in turn was treated with leachate concentration of 50% (15,13,12,10) respectively. In contrast on a concentration 100% there were no germination of these treated spores and there was no germination in the culture media which was treated with leachate. The spore suspension 10^6 of *Trichderma* showed high effect of germination of fungi spores in culture media which recorded a percentage (3,10,5,20) respectively . The effect of *Trichoderma harzianum* leachate and spore suspension on reduced mold in fruit was variant and with its highest effect was on *Rhizopus spp.* , which recorded infection rate of 29.02 for fungal leachate and 35.12 for spore suspension.

Keywords: Tomato, Biological control, Pathogenic fungi, *Trichoderma harzianum*

الملخص

هدفت الدراسة الى تقييم قدرة الفطر *Trichoderma harzianum* كعامل مكافحة للفطريات الممرضة والتي تم عزلها من ثمار نبات الطماطم بعد حصادها والتي شملت , *Fusarium solani , Aspergillus niger, Alternaria spp.* *Rhizopus spp.* والمعزولة من ثمار الطماطة المصابة باستعمال الراشح الفطري والعالق السبوري (10^6 سبورات + اجزاء الهايفة /مل) لفطر المكافحة الاحيائية ، اظهرت النتائج القدرة العالية للراشح الفطري على كبح انبات السبورات للمسببات المرضية في الاوساط الزراعية ، اذ بلغت النسبة المئوية لمعدل انبات الفطريات الممرضة (*Fusarium solani , Aspergillus niger, Alternaria spp. Rhizopus spp*) والمعاملة بالراشح بتركيز 50% (15, 13, 12,10) وعلى التوالي .

بينما لم يظهر اي انبات سبوري لتلك الفطريات المعاملة بتركيز 100% ، اما بالنسبة لنمو الفطر في الاوساط الزرعية المعاملة بالراشح فانه لم يظهر اي نمو لهذه الفطريات ، اظهر العالق السبوري 10^6 للفطر *Trichoderma* تاثير عالي على انبات السبورات الفطرية(*Fusarium solani , Aspergillus niger*) *Alternaria spp. Rhizopus spp* في الوسط الزرعي اذ بلغت النسبة المئوية (3,10,5,20) وعلى التوالي , فيما يخص تاثير الراشح الفطري والعالق السبوري لفطر المكافحة *Trichoderma harzianum* على تقليل التعفن في الثمار فكان متفاوتا وكان اعلى قدرة في التاثير على الفطر *Rhizopus spp.* حيث بلغ مقدار شدة الاصابة 29.02 بالنسبة لمعاملة الراشح الفطري و 35.12 بالنسبة لمعاملة العالق السبوري لفطر المكافحة الاحيائية .

الكلمات المفتاحية :الطماطة ، المكافحة الاحيائية ، الفطريات الممرضة ،*Trichoderma harzianum*

1-المقدمـــــة:

تعد امراض النبات احد اهم العوامل المحددة لنجاح العملية الزراعية اذ تؤدي الى انخفاض كبير في نوعية وكمية الحاصل الزراعي وبالتالي حدوث خسائر اقتصادية كبيرة حيث يوجد مايقارب 50,000 نوع من المسببات الممرضة للنبات تشمل الفطريات , البكتريا,الفيروسات والنيماتودا تعمل بشكل منفرد او مجتمع مما يؤدي الى حدوث هذه الخسائر [1 ,2].

اثبتت الدراسات بما لا يقبل الشك ان المكافحة الكيميائية ليست هي الافضل وان لها اضرارا بيئية عديدة بالاضافة الى الكلفة العالية ، لذا تعد المكافحة البايولوجية باستعمال عوامل مكافحة حيوية تعمل على تثبيط وكبح نمو المسببات الممرضة للنبات وذلك من خلال المنافسة مع تلك المسببات الممرضة للنبات وكذلك تحفيز نمو النبات وبالتالي يتمكن النبات من التغلب على الممرضات النباتية. اشارت العديد من الدراسات الى الدور الفعال للفطر *Trichoderma* كعامل مكافحة حيوية فعال جدا ضد العديد من المسببات المرضية للنبات[3 ,4].

يعد الفطر *Trichoderma harzianum* من اهم الانواع العائدة للجنس *Trichoderma* في مكافحة الممرضات النباتية (Gveroska and Ziberoski.,2012). اشارت دراسة ادم [5] الى ان تغليف بذور الطماطة بالفطر *Trichoderma harzianum* ادى الى خفض الاصابة بالفطر *Fusarium solani* بنسبة 67% كما انه ادى الى كبح الاصابة بالفطر *Sclerotium rolfsii* المسبب لمرض الذبول في الطماطة [6] .

يعد نبات الطماطة من اشهر المحاصيل الزراعية التي يتم زراعته واستهلاكها في العراق، وبنفس الوقت من اكثر المحاصيل الزراعية المعرضة للاصابة بعدد من الفطريات الممرضة والتي سوف تؤثر بشكل كبير على كمية ونوعية محصول نبات الطماطة .

2- المواد وطرائق العمل :

تم اختيار اربعة فطريات مرضية للدراسة وهي Fusarium solani, Aspergillus niger, Alternaria spp. And Rhizopus spp. ولعزل هذه الفطريات المرضية ، تم جمع 50 عينة من ثمار الطماطة المحلية للمدة من 4/1 الى 6/1 2017 من الاسواق المحلية لمحافظة بغداد والتي تظهر عليها اعراض تعفن ، بعدها اجري عليها التعقيم السطحي لثمار الطماطة باستعمال محلول القاصر (هيبوكلورات الصوديوم) بتركيز 1% لمدة 30 دقيقة ثم غسلت عدة مرات باستعمال الماء

الايوني وتجفيفها باستعمال اوراق ترشيح ، بعدها عزلت الفطريات من الثمار المصابة من خلال قطع الانسجة التي يظهر عليها اعراض الاصابة ثم وضعت على سطح الطبق الحاوي على وسط PDA بواسطة ملقط معقم وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 28 م لمدة 3 ايام بعد ذلك تم تنقية المزارع الفطرية بزراعتها عدة مرات على وسط PDA ثم حضرت شرائح زجاجية لهذه المزارع لغرض دراسة صفاتها الدقيقة تحت المجهر الضوئي المركب وقد تم تشخيص الفطريات اعتمادا على المفتاح التصنيفي المعتمد Domsch and Gams , [7]وذلك بالاعتماد على الصفات الزرعية والمجهرية للفطريات وتم حفظ العينات عن طريق عمل slants في الثلاجة وتجدد بين فترة واخرى وذلك لاجزاء التجارب المختبرية عليها .

لتحضير كلا من العالق السبوري للفطريات الممرضة ولقاح الفطر(10^6, 10^8) كونيدة / مل تم مزج المزارع الفطرية القديمة (المنماة لمدة 14 يوم على وسط PDA وبدرجة حرارة 25م) مع الماء المقطر المعقم وتصفية العالق من خلال الشاش المعقم علما ان كثافة الابواغ في العالق تم تحديدها باستعمال (hemocytometer) عداد الكريات تحت المجهر[8] تم تحضير راشح الفطر *Trichoderma harzianum* اذ تم تنمية الفطر في الوسط السائل PDB لمدة 7 ايام في حاضنة هزازة 250 بالدقيقة بدرجة حرارة 25 م بعدها رشحت المزارع الفطرية باستعمال الشاش ، استعملت طريقة Turhan et al., [9]لحساب نسبة انبات الابواغ للممرضات المعاملة بالفطر *Trichoderma harzianum* ومقارنتها بمعاملة السيطرة حيث تم مزج الراشح الفطري لفطر المكافحة الحيوية مع العالق السبوري 10^6 كونيدة / مل للممرضات ثم نميت على وسط PDA لمدة 24 ساعة ، لحساب النمو القطري للممرضات المعاملة بفطر المكافحة الاحيائية ومقارنتها بدون معاملة استعملت طريقة Turhan et al., 1994 حيث تم مزج الراشح الفطر لفطر المكافحة الاحيائية مع وسط PDA بنسبة 3:1حجم/حجم تحت ظروف معقمه وصب بالاطباق ثم زرعت الفطريات الممرضة على تلك الاطباق وقيس النمو القطري لها مع المقارنة ، تم حساب نسبة التعفن على سطح الطماطة باستعمال العالق السبوري ، اذ تم تلقيح سطح الطماطة بمقدار 0.5 مل من العالق السبوري للفطريات الممرضة بتركيز 10^6 و10^8 كونيدة / مل وبثلاث مكررات وبعد ذلك تعامل بالعالق السبوري لفطر المكافحة الاحيائية ثم توضع في اكياس وتحضن لمدة 5 ايام ومقارنتها مع السيطرة ، اما لحساب نسبة التعفن باستعمال الراشح الفطري لفطر المكافحة فقد تم تلقيح سطح الطماطة بالعالق السبوري للفطريات الممرضة بتركيز 10^6 و10^8 كونيدة / مل وبثلاث مكررات وبعد ذلك تعامل بالراشح الفطري وبنسبة 50 % و100% لفطر المكافحة الاحيائية ثم توضع في اكياس وتحضن لمدة 5 ايام ومقارنتها مع السيطرة [10].

3- النتائج والمناقشة:

1.3 تاثير الراشح الفطري للفطر *Trichoderma harzianum* على انبات ابواغ الفطريات المرضية

اظهرت نتائج اختبار تاثير راشح فطر المكافحة الاحيائية على انبات سبورات الفطريات المرضية قدرة عالية على منع انبات السبورات بالنسبة للفطريات الممرضة الاربعة وذلك عند تركيز 100% اذ بلغت صفر % اما عندما يكون التركيز بنسبة 50 % فان انبات السبورات يكون بدرجة قليلة اذ بلغت اعلى نسبة انبات للفطريات المرضية في المعاملة بتركيز 50 % هو الفطر *Fusarium solani* اذ بلغت 20 % بينما كانت الاقل في فطر *Rhizopus* اذ بلغت 11.2 % وربما يعود ذلك لوجود عدد من الانزيمات والتي لها دور فعال في تثبيط انبات الابواغ وهذا ما اشار الية نتائج دراسة كلا من [13.12,11].

جدول 1:تاثير راشح الفطر *Trichoderma harzianum* على انبات ابواغ الفطريات الممرضة

راشح مزرعة فطر*Trichoderma harzianum*					
الفطريات الممرضة	معاملة السيطرة%	بتركيز 50%	النسبة المئوية بالمقارنة مع معاملة السيطرة	تركيز بنسبة 100%	النسبة المئوية بالمقارنة مع معاملة السيطرة
Fusarium solani	75	15	20	0	0
Alternaria spp.	80	13	16.25	0	0
Aspergillus niger	73	12	16.44	0	0
Rhizopus spp.	90	10	11.2	0	0

2.3 تاثير راشح الفطر Trichoderma harzianum على النمو القطري للفطريات المرضة

اظهر الراشح الفطري لفطر المكافحة الحيوية قدرة عالية على منع النمو القطري في الوسط الزرعي PDA اذ لم يؤشر اي نمو لاي نوع من الانواع الممرضة الاربعة في الوسط الزرعي وهذا يؤشر الى ان فطر المكافحة الاحيائية يمتلك قدرة عالية على تثبيط نمو الفطريات الممرضة للنبات وربما يعود ذلك الى وجود مركبات سامة في الراشح منعت نمو الفطريات الممرضة .

جدول 2: تاثير راشح الفطر *Trichoderma harzianum* على النمو القطري للفطريات الممرضة

راشح الفطر *Trichoderma harzianum*		
الفطريات الممرضة	معاملة السيطرة	المعاملة بفطر المكافحة الاحيائية
Fusarium solani	7.5	0
Alternaria spp.	8.3	0
Aspergillus niger	8.8	0
Rhizopus spp.	5.5	0

3.3 تاثير العالق السبوري للفطر *Trichoderma harzianum* على الانبات السبوري للفطريات الممرضة

اثبت العالق السبوري لفطر المكافحة الاحيائية ان له قدرة كبيرة على منع انبات سبورات الفطريات الممرضة على وسط PDA ولكن هذه القدرة جاءت متباينة بين شديدة التاثير كما في الفطر *Fusarium solani* اذ بلغت نسبة الانبات السبوري مقارنة مع معاملة السيطرة 4% بينما كانت شدة الانبات السبوري الاعلى على الفطر *Rhizopus spp.* نسبتة مقارنة مع معاملة السيطرة 22.2% ان هذه النتائج جاءت مختلفة عن نتائج الراشح الفطري لفطر المكافحة الاحيائية وهذا ربما يعود الى عدة اسباب يمكن اختصارها باليات المكافحة التي تختلف بين الراشح الفطري والعالق السبوري اذ ان اليات المكافحة في الراشح هي عبارة عن انزيمات وسموم بينما تكون اليات المكافحة في العالق السبوري معتمدة على التطفل الفطري والتنافس وجميع هذه اليات موجودة لدى فطر المكافحة الاحيائية *Trichoderma harzianum* وهذا ما جعله يتصدر قائمة عوامل المكافحة الاحيائية بالاضافة الى مميزات اخرى عديدةوهي تواجده الواسع وان عملية عزلة لا تحتاج الى تقنيات حديثة وان متطلبات نمو بسيطة ومتوفرة باسعار مناسبة وانه يتميز بقدرته على التطفل على مدى واسع من الفطريات المرضية والتنافس على المكان والغذاء وافراز العديد من المركبات الكيميائية والتي تعمل على استحثاث المقاومة في النبات وقدرته على انتاج العديد من الانزيمات المحللة لجدران خلايا المسببات المرضية وتجهيز النبات بالعناصر المغذية [14 , 16,15].

جدول 3: تاثير العالق السبوري للفطر *Trichoderma harzianum* على الانبات البوغي للفطريات المرضية

راشح المزرعة الفطرية للفطر *Trichoderma harzianum*			
الفطريات الممرضة	معاملة السيطرة	المعاملة بالفطر	النسبة المئوية بالمقارنة مع معاملة السيطرة
Fusarium solani	75	3	4
Alternaria spp.	80	10	12.5
Aspergillus niger	73	5	6.8
Rhizopus spp.	90	20	22.3

4.3 تاثير الراشح الفطري للفطر *Trichoderma harzianum* في تقليل تعفن الثمار

اظهرت نتائج تاثير الراشح الفطري لفطر المكافحة الاحيائية في تقليل التعفن في ثمار الطماطة بالاعتماد على مقدار التعفن في الطماطة , اذ ان الراشح الفطري كانت قدرة متباينة على تقليل شدة الاصابة تراوحت بين ضعيفة عند استعمال راشح بنسبة 50% كانت اقلها في الفطر *Aspergillus niger* حيث بلغت نسبة التعفن 83.22 اماعند تركيز 100% فان تاثير الراشح كان جيدا حيث وصلت شدة الاصابة الى الربع تقريبا كما هو الحال في شدة الاصابة بالنسبة للفطر *Rhizopus spp.* حيث بلغت

29.02 ان السبب ربما يعود الى افراز مركبات سامة اضافة الى افراز الانزيمات المحللة ادت الى تثبيط نمو تلك الفطريات المرضية حيث اشار Djonovic [17] في دراسة سابقة الى انتاج المركبات Glitoxin ,Glioviridin , Peptaibols من قبل انواع الفطر *Trichoderma* لها تاثيرا مثبطا ضد العديد من الفطريات الممرضة للنبات , كما اكدت دراسة Harman et al., [12, 11] الى ان الفطر *Trichoderma* spp. ينتج العديد من الانزيمات المحللة لجدران المسببات المرضية cell Wall Degrading Enzymes (CWDEs) منها Chitinases , Proteases , Glucanases .

جدول 4: تاثير الراشح الفطري للفطر *Trichoderma harzianum* في تقليل تعفن الثمار

راشح المزرعة الفطرية للفطر *Trichoderma harzianum*			
الفطريات الممرضة	معاملة السيطرة	بنسبة 50%	بنسبة 100%
Fusarium solani	100	73	30
Alternaria spp.	100	80.25	40.3
Aspergillus niger	100	83.22	48.11
Rhizopus spp.	100	70.17	29.02

5.3 تاثير العالق السبوري للفطر *Trichoderma harzianum* في تقليل تعفن الثمار

اظهرت نتائج تاثير العالق السبوري لفطر المكافحة الاحيائية في تقليل التعفن ان الفطر ذات كفاءة متفاوتة فعندما كان العالق السبوري بتركيز 10^6 كانت قابليته على التاثير ضعيفة امام الفطريات الممرضة وخاصة الفطر *Aspergills niger* اذ بلغ معدل التعفن 82.4 اما عند استعمال العالق السبوري بتركيز 10^8 فان تاثير على شدة الاصابة كانت عالية وخاصة ضد الفطر *Rhizopus spp.* اذ بلغ معدل التعفن 35.12 ان السبب في قدرة العالق السبوري على كبح الممرضات الفطرية ربما يعود الى قدرة فطر المكافحة الاحيائية على التطفل وهذا ما اشارت الية الدراسات اذ ان للفطر *Trichoderma spp.* القدرة على التطفل او ربما يعود الى قدرة الفطر على التنافس على المواد الغذائية وهي احد اهم مؤشرات القدرة التضادية للفطر باتجاه المسببات المرضية اذ يمتلك الفطر قدرة عالية على التنافس مع الممرضات الفطرية وذلك لامتلاكه طاقة لقاحية عالية تمكنه من السيطرة على الحيز البيئي واقصاء المنافس له [21,20.19,18]

جدول 5: تاثير العالق السبوري للفطر *Trichoderma harzianum* في تقليل تعفن الثمار

العالق السبوري للفطر *Trichoderma harzianum*			
10^8	10^6	معاملة السيطرة	الفطريات الممرضة
49.3	79	100	*Fusarium solani*
40.22	80.5	100	*Alternaria spp.*
39.11	82.4	100	*Aspergillus niger*
35.12	77.13	100	*Rhizopus spp.*

4. الاستنتاجات

ان من اهم استنتاجات هذه الدراسة هي ان من المحتمل اصابة ثمار الطماطة بعدد من الفطريات المرضية Fusarium solani, Aspergillus niger, Alternaria spp. Rhizopus spp التي تؤثر بشكل مباشر على جودة الحاصل وبالتالي قيمته الاقتصادية لذا يفضل اللجوء الى رش حاصل الطماطة بعد الحصاد براشح الفطر Trichoderma harzianum الذي اظهر كفاءة عالية في تثبيط نمو عدد كبير من الفطريات الممرضة للنبات.

جدول المختصرات

الرمز المختصر	الرمز كاملا
PDA	Potato Dextrose Agar

References

[1] F.Calzarano, I.Seghetti, M. Del carlo, A.Cichehhia , "Effect of Esca of the equality of Berries" , Musts and Wines Phytopathologia Mideterrenia , 43 (2004) 125-135.

[2] I.Madden , M.Wheelis, "The threat of plant pathogens as weapons aginst U.S.crops .Annu.", Rev.Phytopathol.,41(2003)155-176.

[3] P.Gilreath,"Manatee vegetable newsletter", University of Florida , manatee county extension service, (2002) .

[4] R.Cook, " Advances in plant health management in the 20th century" ,Ann. Rev. Phytopathology ,38(2000)95-116 .

[5] K.Adam,"Integrated control of disease rot seeds and the death of tomato seedlings" , Ph.D.thesis. Faculty of Agriculture and Forestry , University of Mosul , Iraq,(2000).

[6] M.Hussein, M. Hassan, A.Allam and K.Abo-Elyousr," Management of Stemphylium blight of Onion by using biological agents and resistance inducers Egypt" ,J.Phytopathol., 35(2007) 49-60.

[7] K.Domsch and H.Gams,"Compendium of soil fungi" 1st ed.Academic press, (1980) 803-808.

[8] N.Ozbay ,S. Newman ,S. Brown," Evolustion of Trichoderma harzianum strains to control crown and root rot of greenhouse fresh market tomatos ,Egypt" ,J.Phytopathol., 42(2004) 19-27 .

[9] G.Turhan , F.Grossunann,"Antagonistic activity of five Myrothecium spp against fungi and bacteria in vitro.", J. Phytopathol. 140 (1994) 97–113.

[10] G.Laura, K.Nancy, Y.Kazunari, H.Guido and K.Kiroku,"Impact of Tricoderma harzainum biocontrol agent of functional diversity of soil microbial community in Tobacco monoculture in Argentina World", Journal of Agricultural Sciences 4(5) (2008)527-532.

[11] S.Harman, C.Howell, A.Viterbo, I.Chet and M.Lorito,"Trichoderma species –Opportunistic Avirulent plant symbionts", Nature Reviews, 2(2004a) 43-56.

[12] S.Harman,E. Petzoldt, R. Comis and J.Chen,"Interactions between Trichoderma harzianum strain and Maize inbred line MO17 and effect of these interactions on diseases caused by Pythium ultimum and Colletotrichum graminicola", Phytopathology ,94(2004b)147-153.

[13] D.Kim,M. Baek,P.Uribe , C.Kenerley and D.Cook, "Cloning and characterization of multiple Glycosyl hydrolase from Trichoderma", Soil Boil.Biochem 40(2002)374-384.

[14] V.Singh, P.Singh, L.Yadav, S.Awasthi, B.Joshi, R.Singh , R. Lal and S. Duttamajumder,"Increasing the efficacy of Trichoderma harzianum for nutrient uptake and control of red rot in Sugarcane", Journal of Horticulture and Forestry, 2(4) (2010) 66-71.

[15] F.Vinale, K. Sivasithamparam, E. Ghisalberti , R.Marra,S. Woo, and M.Lorito, "Trichoderma –Plant Pathogen interactions",Soil Boil.Biochem.,40(2008) 1-10.

[16] C.Howell,"Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: The history and evolution concepts", Eur.j.Plant Potato .,87(1) (2003) 4-10.

[17] S.Djonovic, " Role of tow secreted proteins from Trichoderms virens in mycoparasitism and induction of plant resistance", Ph.D. Dissertation, Texas A&M University (2005).

[18] Y.Elad and A.Kapat ,"The role of Trichoderma harzianum protease in the biocontrol of Botrytis cinerea", Eur.j.Plant Potato,105(1999)177-189.

[19] B.IbrahimInduce, "Biotype from the fungus Trichoderma to improve the efficiency of the agents biocontrol and stimulation in qualities and growth plant", Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture and Forestry, University of Mosul, Iraq (2009).

[20] J.Montealegre , L.Valderrama, N.Sanchez, R.Herrera ,X. Besoain and I.Perez, "Biological control of Rhizoctonia solani in tomatos with trichoderma harzianum mutants", Electronic journal of Biotechnology ,13(2) (2010)1-11.

[21] B.Gveroska and J.Ziberoski "Trichoderma harzianum as a biocontrol agent against Alternaria alternate on Tobacco", ATI-applied technologies & innovations ,7(2) (2012) 67-76.